

# Dynamics of the phosphatidylserine-expressing cell surface during endocytosis of Annexin A5

Citation for published version (APA):

van Genderen, H. (2007). *Dynamics of the phosphatidylserine-expressing cell surface during endocytosis of Annexin A5*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20071018hg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20071018hg](https://doi.org/10.26481/dis.20071018hg)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

## **Samenvatting**

Behorende bij het proefschrift:

### **Dynamics of the phosphatidylserine-expressing cell surface during endocytosis of annexin A5**

Hugo van Genderen, 18 oktober 2007

## Inleiding

De annexine familie bestaat uit eiwitten die gemeenschappelijke structurele en functionele eigenschappen hebben. Annexine A5, een lid van deze familie, is in staat om in de aanwezigheid van calcium ionen aan een membraan te binden die negatief geladen fosfatidylserine (PS) bevat. De tertiaire (drie-dimensionale) structuur van annexine A5 bestaat uit vier domeinen, met elk 70 aminozuren, die cyclisch georganiseerd zijn. Annexine A5 moleculen gaan in een oplossing, in afwezigheid van calcium of een PS bevattende membraan, geen interacties met elkaar aan. Echter membraan gebonden annexine A5 moleculen (monomeren) associëren met elkaar, via eiwit-eiwit interacties, tot structuren (trimeren) die elk opgebouwd zijn uit drie annexine A5 moleculen. Trimeren kunnen vervolgens een twee-dimensionaal membraan gebonden kristal rooster vormen die beschreven kan worden door middel van P3 of P6 rotatie symmetrie.

In dit proefschrift hebben we onderzocht of binding van annexine A5 aan PS en de daaropvolgende trimer vorming invloed heeft op de dynamica van de PS bevattende plasma membraan. We hebben gekozen om de interactie van annexin A5 met PS te bestuderen op PS bevattende cel oppervlakken die bloot gesteld zijn aan de omgeving buiten de cel om de volgende redenen. (1) Annexin A5 moleculen komen voor in het binnenste van een cel en in bloed. (2) De calcium concentratie binnen in een cel is ongeveer 0,1 micro-molair en de calcium concentratie van bloed is 1000 micro-molair. (3) Annexine A5 kan het oppervlak van een PS bevattende membraan die bestaat uit 20 mol% en 5 mol% PS voor de helft bezetten bij een calcium concentratie die gelijk is aan respectievelijk 1500 en 220 micro-molair. Uit het voorgaande kan afgeleid worden dat annexine A5 veel makkelijker bindt aan een PS bevattende membraan als dit eiwit zich in het bloed bevindt.

Er zijn verschillende processen waarbij een PS bevattende membraan een rol speelt. Bloed plaatjes die aan collageen vast gehecht zitten brengen PS tot expressie op het membraan oppervlak. De bloed stollings factoren Va, Xa en prothrombine kunnen op dit PS bevattende membraan binden en het prothrombinase eiwit complex vormen. Het prothrombinase complex is verantwoordelijk voor de omzetting van het inactieve eiwit prothrombine naar het actieve thrombine. Thrombine is daaropvolgend betrokken bij het omzetten van het inactieve en oplosbare eiwit fibrinogeen naar fibrine. Fibrine moleculen kunnen onderling associaties aangaan die leiden tot de formatie van lange polymeren (kettingen) die bestaan uit fibrine moleculen. De fibrine polymeren worden gevormd op plaatsen waar een beschadiging van het bloedvat heeft plaats gevonden. Het netwerk van bloed plaatjes en fibrine polymeren is verantwoordelijk voor het voorkomen van het lekken van bloed uit het beschadigde bloedvat.

Er is voorgesteld dat annexine A5 moleculen een rol spelen in het remmen van het bloed stollings proces. Annexin A5 moleculen kunnen een competitie

aangaan met de stollings factoren prothrombine, factor Va en factor Xa door het binden aan een PS bevattende membraan. In dit competitie proces kunnen annexine A5 moleculen de vorming van het prothrombinase complex voorkomen en de daaropvolgende activering van het eiwit thrombine. Een ander proces waarbij een PS bevattende membraan een rol speelt is het cel dood proces. De cel inhoud wordt van de omgeving afgeschermd door middel van een plasma membraan. De zijde van de plasma membraan die bloot gesteld is aan de omgeving bevat normaal geen negatief geladen PS moleculen. In geval van een beschadiging van de cel, cellen die een hoge ouderdom hebben of cellen die ongewild zijn kan de plasma membraan PS bevatten. Het presenteren van PS op de plasma membraan aan de omgeving van de cel is één van de vele eigenschappen die karakteristiek zijn voor een cel die het cel dood proces ondergaat. Er is voorgesteld dat binding van annexine A5 op de PS bevattende plasma membraan het verloop van het cel dood proces kan vertragen. De voorgaande voorbeelden geven aanleiding tot de gedachte dat annexin A5 invloed heeft op biochemische processen die zich afspelen op de PS bevattende plasma membraan van cellen. In dit proefschrift hebben we de invloed van annexine A5 op verschillende processen die zich afspelen op de PS bevattende plasma membraan onderzocht. Tijdens het cel dood proces wordt er niet alleen PS op de plasma membraan gepresenteerd maar er worden ook bolvormige membraan omsloten fragmenten (micro-partikels) afgescheiden. In hoofdstuk 3 staat beschreven dat annexine A5 de vorming van micro-partikels kan remmen. Er staat ook beschreven dat annexine A5, na binding aan de PS bevattende plasma membraan, opgenomen wordt door de cel (endocytose) via een nog niet eerder beschreven endocytose proces. In hoofdstuk 4 staat beschreven dat annexine A5 verantwoordelijk is voor de endocytose van het membraan eiwit tissue factor. En in het laatste hoofdstuk staan de veranderingen beschreven die optreden op de plasma membraan van monocytien die het cel dood proces ondergaan.

#### **Welke rol speelt het twee-dimensionale kristal van annexine A5 op de plasma membraan?**

In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht wat de rol is van het twee-dimensionale kristal van annexine A5 op de PS bevattende plasma membraan. Er zijn verschillende voorstellen gedaan voor de rol van het twee-dimensionale kristal van annexine A5 op de plasma membraan. De bloed stollings factoren Va, Xa en prothrombine kunnen het prothrombinase complex vormen op een PS bevattende membraan. Harry Andree en collega's hebben voorgesteld dat annexine A5 de vorming van het prothrombinase complex niet alleen kan remmen via een competitie proces voor PS binding maar ook via de vorming van het twee-dimensionale kristal rooster. De bloed stollings factoren Va, Xa en prothrombine binden en bewegen eerst op het oppervlak van de PS bevattende membraan alvorens het prothrombinase complex te vormen. Harry Andree en collega's hebben voorgesteld dat het twee-dimensionale kristal rooster van

annexine A5 de beweging voorkomt van de stollings factoren die al aan PS gebonden zijn zodat er geen prothrombinase complex gevormd kan worden. Een andere rol van het twee-dimensionale kristal rooster is voorgesteld door Gidon-Jeangirard en collega's. Tijdens het cel dood proces worden bolvormige en membraan omsloten fragmenten (micro-partikels) van de PS bevattende plasma membraan afgescheiden. Gidon-Jeangirard en collega's namen waar dat annexine A5 de vorming van micro-partikels kon remmen. Zij stelden voor dat de aanwezigheid van een mechanische beperking op de plasma membraan in de vorm van het twee-dimensionale kristal rooster van annexine A5 verantwoordelijk was voor remming van micro-partikel vorming.

#### **Remming van micro-partikels door annexine A5**

Micro-partikel vorming werd bestudeerd door middel van een model systeem bestaande uit Jurkat lymfoma cellen die gestimuleerd werden om het cel dood proces te ondergaan met behulp van een anti-lichaam gericht tegen de Fas-receptor. We namen waar dat annexine A5, dosis afhankelijk, in staat was de vorming van micro-partikels te remmen. We gebruikten de annexine A5 mutant 2D1-6 om te testen of het twee-dimensionale kristal rooster van annexine A5 verantwoordelijk was voor de remming van micro-partikels. De annexine A5 mutant 2D1-6 kan aan PS binden maar door de aanwezigheid van zes mutaties kan deze mutant geen twee-dimensionale kristal rooster meer vormen. Experimenten uitgevoerd met 2D1-6 lieten zien dat de annexine A5 mutant in staat was micro-partikel vorming te remmen. We concludeerden hieruit dat remming van micro-partikel vorming door annexine A5 niet veroorzaakt werd door het twee-dimensionale kristal rooster. Deze conclusie werd ondersteund door de resultaten van experimenten die uitgevoerd werden met annexine A1, een lid van de annexine familie die aan PS kan binden maar die geen twee-dimensionaal kristal rooster kan vormen. We namen waar dat ook annexine A1, dosis afhankelijk, de vorming van micro-partikels kon remmen.

Hoe annexine A5 de vorming van micro-partikels remt is op dit moment niet duidelijk. In de afgelopen jaren zijn er artikelen verschenen waarin gemeld werd dat, membraan eiwit bevattende, micro-partikels een rol spelen in de communicatie tussen cellen en in de overdracht van membraan eiwitten tussen verschillende soorten cellen. Een voorbeeld hiervan is de door monocyten (een type witte bloed) afgescheiden micropartikels die de membraan eiwitten tissue factor (TF) en P-selectine glycoproteïne ligand-1 (PSGL-1) bevatten. Er is gerapporteerd dat deze micropartikels zich ophopen op bloed-plaatjes die aanwezig zijn op plaatsen waar vaatwand beschadiging heeft plaats gevonden. Annexine A5 zou een rol kunnen spelen in deze micropartikel gerelateerde processen als er aan de volgende voorwaarden voldaan wordt: (1), de micropartikels bevatten PS op het membraan oppervlak en (2), de concentratie van annexine A5 in het bloed is hoog genoeg om remming van micropartikel vorming te veroorzaken.

### **Endocytose van annexine A5**

Gedurende het onderzoek naar de door annexine A5 veroorzaakte remming van micropartikel vorming namen we waar dat annexine A5 werd opgenomen (endocytose) door cellen met PS op het cel oppervlak. Endocytose was afhankelijk van de aanwezigheid van PS op het cel oppervlak omdat annexine A5 wel maar de annexine A5 mutant M1234 (welke niet in staat is om PS te binden) niet werd opgenomen. Het mechanisme dat verantwoordelijk was voor endocytose van annexine A5 was niet gelijk aan macropinocytose of de caveolaire en clathrine afhankelijke endocytose. Deze resultaten laten zien dat annexine A5 wordt opgenomen via een nieuw endocytose proces.

Er is gesuggereerd dat annexine A5 in staat is om calcium-ion geleidende kanalen in de plasma membraan te vormen. Calcium speelt een rol in signaal processen in de cel, het is dus mogelijk dat kanaal vorming van annexine A5 een rol speelt bij endocytose van annexine A5. Kanaal vorming van annexine A5 treedt echter alleen op als de calcium concentratie laag is zoals binnen in een cel. Buiten de cel, in bloed, treedt geen kanaal vorming op zodat het annexine A5 geïnduceerde endocytose proces niet wordt veroorzaakt door kanaal vorming van annexine A5.

Nadat we hadden uitgesloten dat kanaalvorming van annexin A5 een rol speelt in het endocytose proces besloten we de rol van het twee dimensionaal kristal, gevormd door annexine A5, in het opname proces te bestuderen. We testten de betrokkenheid van het twee-dimensionale kristal in het endocytose proces door apoptotische Jurkat lymfoma cellen en HeLa tumor cellen te incuberen met fluorescente 2D1-6. Analyse van de cellen met behulp van confocale scan laser microscopie (CSLM) toonde aan dat de cellen geen fluorescente 2D1-6 hadden opgenomen. Uit de resultaten van dit experiment trokken we de conclusie dat de vorming van het twee-dimensional kristal noodzakelijk is voor de opname van annexine A5 door beide cel typen. Deze conclusie werd ondersteund door de resultaten van een experiment met fluorescente annexine A1. We vonden dat deze annexine niet werd opgenomen door de apoptotische Jurkat lymfoma en HeLa tumor cellen.

Waarom speelt het door annexine A5 gevormde twee-dimensionale kristal rooster een rol in het endocytose proces? De zijde van het annexine A5 molecuul dat aan negatief geladen PS bind heeft een bolle (convexe) vorm. Annexine A5 behoudt zijn convexe vorm als het annexine A5 molecuul aan een PS bevattende membraan bindt en een trimer vormt. We stellen voor dat de annexine A5 trimeren, waaruit het twee-dimensionale kristal is opgebouwd, de membraan vervormen en ombuigen zodat er endocytische bolvormige structuren ontstaan binnen in de cel. Annexine A5 veroorzaakt in dit hypothetische proces zijn eigen opname door de cel.

### **Annexine A5 veroorzaakt endocytose van tissue factor**

Er is voorgesteld dat annexine A5 een rol speelt in de remming van bloed stollings processen. (1) Annexine A5 kan bloed stolling remmen door aan PS te binden. (2) Annexine A5 kan bloed stolling ook remmen door de vorming van een twee-dimensionaal kristal op de PS bevattende membraan. Ravassa en collega's hebben voorgesteld dat er nog een derde manier bestaat waarmee annexine A5 de bloed stolling kan remmen. Annexine A5 kan de bloed stolling ook remmen door internalisatie van tissue factor te veroorzaken op dode cellen. Tissue factor (TF) is een eiwit die aanwezig is in de plasma membraan van bepaalde cel typen. Dit eiwit is in staat de bloedstollings factor VIIa te binden. Het eiwit complex TF en factor VIIa katalyseert de vorming van actieve factor X uit inactieve factor X. De vorming van het complex bestaande uit TF, factor VIIa en factor X en de daaropvolgende vorming van factor Xa uit factor X vinden plaats als PS aanwezig is in de membraan.

Er is echter reden tot twijfel dat het proces voorgesteld door Ravassa en collega's fysiologisch van belang is. Cellen die PS op de plasma membraan presenteren worden zeer snel verwijderd door macrofagen. Als het annexine A5 endocytose proces een rol van belang speelt dan moet het endocytose proces plaats vinden voordat de apoptotische cel is verwijderd door macrofagen. We onderzochten of endocytose van TF door annexine A5 plaats vindt in levende cellen in een model systeem bestaande uit HeLa cellen getransfecteerd met TF cDNA. Met dit model systeem lieten we zien dat TF endocytose onder invloed van annexine A5 plaats vind door te laten zien dat annexine A5 endocytose van fluorescent factor VIIa veroorzaakt in TF cDNA getransfecteerde cellen. Dit resultaat laat zien dat annexine A5 niet alleen endocytose veroorzaakt van TF in dode cellen maar ook in levende cellen. Annexine A5 veroorzaakte internalisatie van TF door dode cellen veroorzaakte een afname in de activiteit van TF. We namen echter geen afname van TF activiteit waar in levende HeLa cellen. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door recycling van TF na internalisatie terug naar het cel oppervlak door levende cellen. In dode cellen treedt geen recycling van TF op waarschijnlijk door een defect recycling mechanisme.

Er zijn de laatste jaren enkele artikelen verschenen waarin gerapporteerd wordt dat levende cellen PS op de plasma membraan presenteren. Twee voorbeelden zijn monocytten die differentieren tot macrofagen en monocytten gestimuleerd met het eiwit galectine-1. De resultaten die beschreven zijn in hoofdstuk 4 geven aanleiding tot de gedachte dat annexine A5 bij deze cellen de endocytose van TF kan veroorzaken.

De concentratie van receptoren op de plasma membraan kan gereguleerd worden door de caveolaire en clathrine gemedieerde endocytose processen. De resultaten die beschreven zijn in hoofdstuk 4 geven aanleiding tot de gedachte dat annexine A5 ook betrokken zou kunnen zijn bij de regulatie van plasma membraan receptoren. Receptoren die door annexine A5 geëndocyteerd zouden kunnen worden zijn receptoren die homoloog zijn aan

TF zoals de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) receptor of andere receptoren die lid zijn van de klasse II cytokine receptor familie.

#### **De functionaliteit van PSGL-1 op apoptotische THP-1 cellen**

In hoofdstuk 5 onderzochten we het effect van veranderingen, die optreden op de plasma membraan van apoptotische THP-1 monocyte cellen, op de membraan eiwitten TF en PSGL-1. Monocyten kunnen micropartikels afscheiden die de membraan eiwitten TF en PSGL-1 bevatten. Dit is alleen mogelijk als de eiwitten TF en PSGL-1 zich dicht bij elkaar op de plasma membraan bevinden. Omdat annexine A5 de endocytose van TF veroorzaakt besloten we te onderzoeken of annexine A5 de functionaliteit van PSGL-1, door middel van endocytose, kan beïnvloeden. Het onderzoek naar de functionaliteit van PSGL-1 tijdens het apoptose proces liet echter zien dat de functionaliteit van PSGL-1 verandert zonder dat annexine A5 veroorzaakte endocytose betrokken is. Monocyten zijn via PSGL-1 in staat te rollen en te hechten aan vast gehechte bloed plaatjes die P-selectine presenteren aan de omgeving. Wij toonden aan dat apoptotische THP-1 monocyten niet meer in staat waren te rollen en te hechten door dat deze cellen PSGL-1 afscheiden en door dat PSGL-1 niet meer vast gehecht was aan het cytoskelet.